

产品手册

NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line

NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-)细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.1

目录

一、	产品基本信息及组分	3
二、	包装、运输及储存	3
三、	产品描述	4
四、	材料准备	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备	5
2.	试剂耗材准备	5
五、	细胞复苏、传代、冻存	6
1.	细胞复苏	6
2.	细胞传代	6
3.	细胞冻存	6
六、	使用方法	7
1.	激活验证实验	7
1)	加样步骤	7
2)	报告基因检测	8
1)	验证结果	9
附录 1	流式验证结果	10
附录 2	流式验证结果	10
相关产品		11
使用许可协议:		11

一、 产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C48178	NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C48178	NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

二、 包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 产品描述

活化 T 细胞核因子 (NFAT) 是一种重要的转录因子家族，在免疫反应中起着诱导基因转录的关键作用。它不仅表达于 T 细胞，也存在于 B 细胞、NK 细胞、肥大细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞等多种免疫细胞中，其活性受钙调磷酸酶 (calcineurin) 的钙依赖性调节。NFAT 参与调控 T 细胞的活化、分化和自身免疫耐受，并与哮喘、阿尔茨海默病、炎症性肠病、糖尿病、骨质疏松、骨关节炎和心肌炎等多种疾病的发生密切相关。

CD4 是 T 细胞表面的共受体分子，其胞外结构域与 MHC II 类分子结合，胞内结构域通过蛋白酪氨酸激酶 p56^{lck} 与 TCR-CD3 复合物偶联。在抗原识别过程中，CD4 可增强 TCR 与 pMHC II 复合物的结合稳定性，并通过 lck 放大 TCR 下游信号。

吉满生物 NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line 是基于 CD4 Knockout 细胞构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。采用慢病毒感染的方式，构建稳定表达 NFAT-Luc 报告基因的细胞系，同时又敲除 Jurkat 内源表达的 CD4，消除共受体对 TCR 信号的增强效应，使该模型适用于评估不依赖 CD4 的 TCR 激活策略，或作为 CD4 相关功能研究的阴性对照，从而更精准地解析 TCR 信号本身或特定药物 (如 TCR 激动剂、双特异性抗体) 的激活能力。

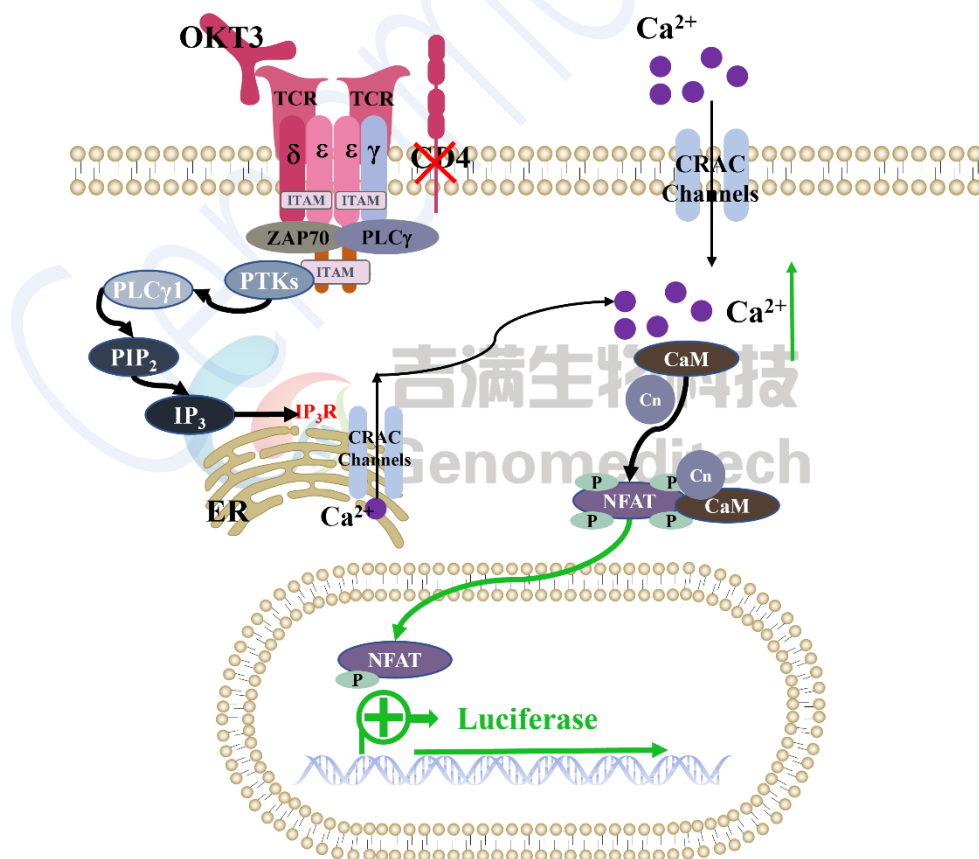


Fig1. 信号原理图

四、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+3.5 µg/mL Blasticidin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+1% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
RPMI 1640	500 mL	Gibco/C11875500BT
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
96 well round cell culture plate	96-well	Thermo/236108
96-well White Opaque Plate	96-well	Thermo/442404
96-well U-bottom Plate	96-well	Saining/1014010
Anti-H_CD4 hIgG1 Antibody(Tregalizumab)	/	Genomeditech/GM-28752AB
Anti-CD3 epsilon Antibody [OKT-3 (muromonab)]	/	Genomeditech/GM-51478AB
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、 细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀，176 × g，离心 5 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 通过补加复苏培养基的形式，调整活细胞密度到 $4-6 \times 10^5$ cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL 悬液），竖瓶培养。

3. 细胞冻存

- 使用 176 × g，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. 细胞传代

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 此细胞为淋巴细胞状，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 当细胞密度达到 $1.5-2 \times 10^6$ cells/mL，1 传 3，隔 2-3 天继续传代，不要让其密度超 2×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 该细胞对密度较为敏感，培养、传代时请注意保持细胞密度在合适的范围。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。
- FBS 需 56°C 水浴 30 分钟，可热灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、 使用方法

1. 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line 细胞量为 5×10^4 cells/孔。使用 Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)] (以下简称为 OKT-3) 作为阳性药物。起始浓度(Conc.01)为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照。周围为 $100 \mu\text{L}$ PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	OKT-3	PBS	1.00 $\mu\text{g/mL}$	333.33 ng/mL	111.11 ng/mL	37.04 ng/mL	12.35 ng/mL	4.12 ng/mL	1.37 ng/mL	457.25 pg/mL	152.42 pg/mL	0	PBS
C		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D													
E													
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 实验前 1-2 h，离心收集 NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line，以 Assay Buffer 重悬细胞，计算细胞密度及活力，通过补加 Assay Buffer 的方式，调整细胞浓度到 1×10^6 cells/mL，以排枪加 $50 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔，周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 U 底板准备抗体稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 准备母液

抗体名称	储液	母液	配置方法
OKT-3	6.3 mg/mL	0.063 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $198 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- e) 96 孔 U 底板中,加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 180 μ L Assay Buffer, B2-B11 孔, 加入 120 μ L Assay Buffer。
- f) 吸取不同体积的待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中(如 B2 中加入 5.90 μ L OKT-3), 混匀。

母液吸取		梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 60 μ L, 加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	5.90 μ L OKT-3	加入	180 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	120 μ L	
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60 μ L, 加入到第二个梯度稀释孔 B3, 充分混匀以此类推, 直至第 9 个梯度稀释孔 (B10) 。
- h) 将步骤 a 准备好的细胞孔板取出, 加入步骤 g 准备好的梯度稀释液, 每孔 50 μ L。
- i) 盖上检测板盖, 于 37°C CO₂ 培养箱中培养 6 h。
- j) 收样, 转至 96 孔白底板上机, 检测 Luciferase。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line	0 μ g/mL	1 μ g/mL	152.42 pg/mL
	4422	485700	4322

1) 验证结果

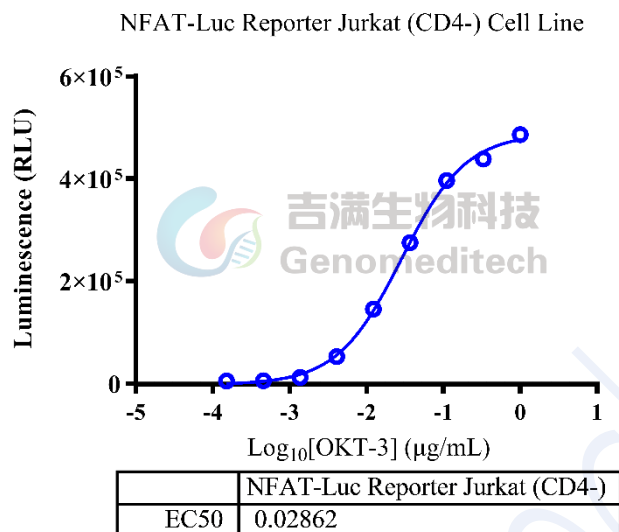


Fig 2. Response to Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)]. The NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line (Cat. GM-C48178) at a concentration of 5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)] (Cat. GM-51478AB) in assay buffer (RPMI 1640+1% FBS+1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [109.8]. Data are shown by drug mass concentration.

附录 1 流式验证结果

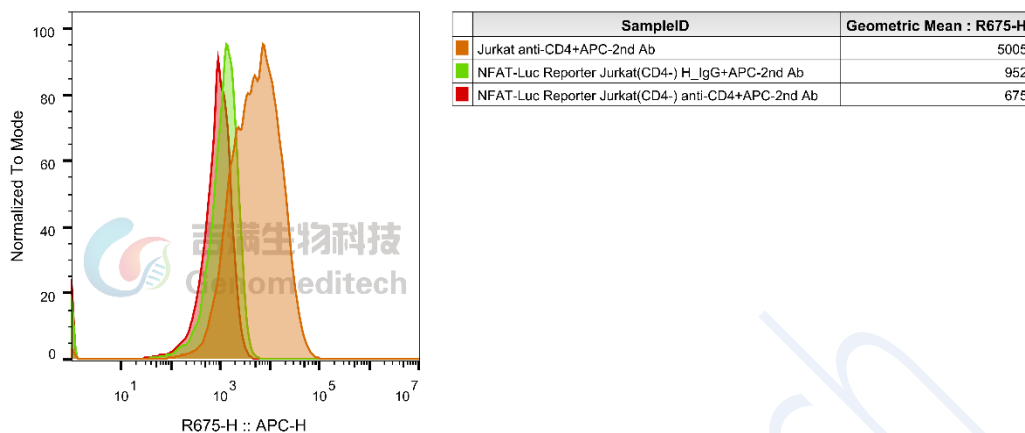


Fig 3. NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line (Cat. GM-C48178) was determined by flow cytometry using Anti-H_CD4 hIgG1 Antibody(Tregalizumab) (Cat. GM-28752AB).

附录 2 流式验证结果

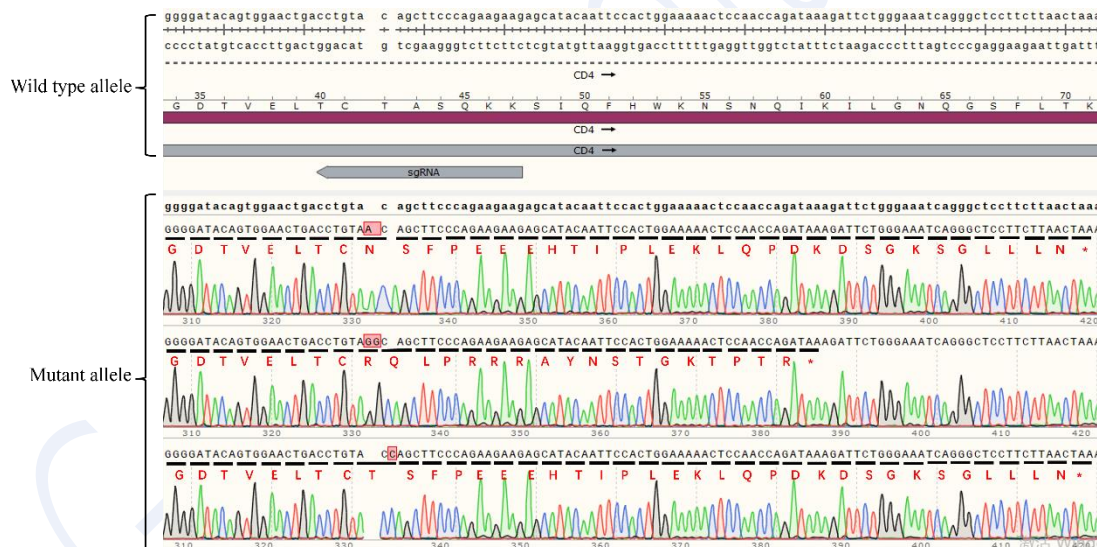


Fig 4. The Sanger sequencing of the NFAT-Luc Reporter Jurkat (CD4-) Cell Line (Cat. GM-C48178) showed successful knockout of Human CD4.

相关产品

TCR	
H_FOXP3-Promoter Reporter Jurkat Cell Line	H_IL2-Promoter Reporter Jurkat Cell Line
NFAT-Luc Reporter Jurkat Cell Line	TCR Knockout Reporter Cell Line(CD4+)
OKT3(CD3 ScFv) CHO-K1 Cell Line	
Anti-CD3×CD19 Bispecific Antibody (Blinbio)	Anti-CD3-CD19 Bispecific Antibody(Blinatumomab)

使用许可协议：

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。